

LI-6400; Gazometrická stanovení fotosyntetických parametrů

18. dubna 2008

Tato úloha by Vás měla seznámit s gazometrickými metodami stanovení fotosyntetické aktivity rostlin potažmo s přístrojem LI-6400, který v současné době, patří k nejpoužívanějším gazometrickým systémům ve fyziologii a ekofyziologii rostlin. Principy měření, vyhodnocení a interpretace naměřených parametrů budou demonstrovány na rozdílné asimilaci CO₂ u C₃ a C₄ rostlin. Zopakujte si proto, v čem tkví rozdíl mezi těmito fotosyntetickými typy (viz. Fyziologie rostlin, Procházka et al.; nebo Učební texty fyziologie rostlin kap. 5. Enzymové reakce fotosyntézy; aj.).

Úvod

List fixuje ve fotosyntéze CO₂, který proudí z vnější atmosféry. Současně ale uvolňuje CO₂ při respiračních pochodech. Na světle u nestresovaného zeleného listu převládá většinou fotosyntéza nad respirací. To, co budeme měřit je bilance obou procesů a nazývá se „rychlost čisté fotosyntézy“ (A) a vyjadřuje se jako hustota toku CO₂ na jednotku plochy listu za čas ($\mu\text{mol}(\text{CO}_2)\text{m}^{-2}(\text{listu})\text{s}^{-1}$). Gazometrické metody umožňují měření rychlosti výměny plynů mezi listem a okolní atmosférou. Příjem resp. výdej CO₂ se projeví změnou koncentrace CO₂ v atmosféře obklopující měřený objekt. Tato změna je měřena pomocí infračerveného analyzátoru plynů (IRGA). A je výrazně závislá na dvou faktorech *i*) intenzitě dopadající radiace (I) (tzv. „světelná křivka fotosyntézy“) a *ii*) koncentraci CO₂ v okolní atmosféře (tzv. „CO₂ křivka fotosyntézy“). Z těchto závislostí lze stanovit fotosyntetické parametry, které danou rostlinu (list) charakterizují z biofyzikálního a biochemického hlediska.

Tato úloha je zaměřené na porovnání rostlin s C₃ a C₄ metabolismem asimilace CO₂. Z naměřených křivek a vypočtených parametrů bude zřetelný rozdíl v jejich mechanismu asimilace CO₂a využití dopadající radiace.

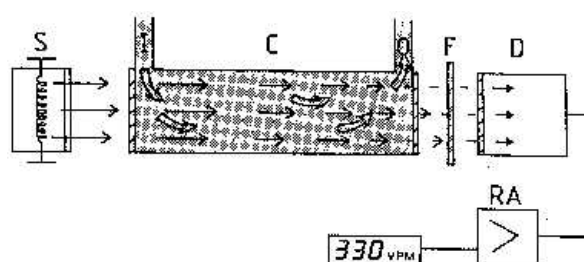
1 Princip měření a výpočty

1.1 Princip infračervené analýzy plynů

Heteroatomické molekuly absorbují záření při specifických vlnových délkách v infračervené oblasti, přičemž každý plyn má charakteristické absorpční spektrum. Molekuly složené ze dvou identických atomů, mají nulový dipólový moment, (např. O₂, N₂) toto dlouhovlnné infračervené záření neabsorbují, a tudíž nepřekáží při stanovení koncentrace heteroatomických molekul. Z nejběžnějších plynů a par majících absorpci v infračervené oblasti spektra lze uvést: CO₂, H₂O, NH₃, CO, N₂O, NO, SO₂, HCN, plynné uhlovodíky, všechny vyšší uhlovodíky apod. Hlavní absorpční pás CO₂ je při 4.25 μm s druhotnými maximy při 2.66, 2.77 a 14.99 μm .

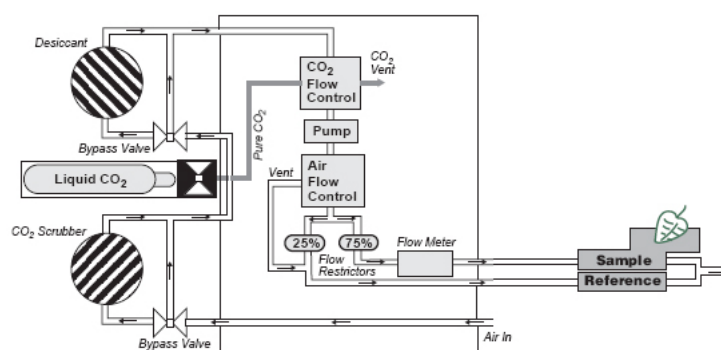
Jediný plyn, normálně přítomný ve vzduchu s absorpčním spektrem překrývající absorpční spektrum CO_2 (společné maximum při $2.7 \mu\text{m}$) je vodní pára. Výsledné spektrum je kombinací elektronového, rotačního a vibračního spektra. Absorpční čáry pak odpovídají rotaci dané molekuly.

IRGA se skládá ze čtyř základních částí: široko-spektrální zdroj infračerveného (IR) záření, asimilační komora, optický filtr a detektor. Přítomnost CO_2 v kyvetě způsobí pokles radiace, což je stanoveno detektorem, a dojde k poklesu výstupního signálu detektoru. Elektronicky zpracovaný signál je převeden na koncentraci. Optický filtr ohraničuje záření na spektrální pásy, které jsou absorbovány určitými plyny.



Obr. 1: Nákres jednoduchého infračerveného analyzátoru plynů (IRGA). Infračervené záření vyzářované ze zdroje (S) prochází přes kyvetu (C), kterou proudí plyn dovnitř (I) a ven (O). Infračervená radiace vycházející z kyvety prochází přes širokospektrální filtr (nejčastěji centrováný na $4,3 \mu\text{m}$), a pak je analyzována detektorem (D). Signál z detektoru je zesílen (RA). Jakýkoliv nárůst koncentrace plynu v kyvetě, který absorbuje v IR oblasti, v kyvetě, se projeví jako pokles v signálu na detektoru.

1.2 Uspořádání otevřeného gazometrického systému LI-6400



Obr. 2: Schématické znázornění toku vzduchu v LI-6400. Vzduch je nasáván membránovou pumpou z vnější atmosféry. Dále prochází kolonami, které zbavují vzduch i) oxidu uhličitého (CO_2 scrubber) a ii) vodní páry (desiccant). Vzduch je následně upravován na námi požadovanou koncentraci CO_2 přidáváním potřebného množství plynu z externího zdroje CO_2 . Před vstupem do asimilační komory, kde je umístěn list, je měřena rychlost průtoku vzduchu.

1.3 Jak přístroj počítá gazometrické parametry?

Vše, co je uvedeno v této kapitole, udělá za vás přístroj. Teorie výpočtů je zde uvedena jen proto, aby LICOR pro zvědavé nebyl příliš černou skříňkou.

Fotosyntetizující list, uzavřený v komoře, bude pohlcovat CO_2 . Známe-li průtok vzduchu komorou F , koncentrace CO_2 ve vzduchu vstupujícím do komory, c_I , a ve vystupujícím vzduchu po jeho styku s listem, c_O , a plochu listu uzavřeného v komoře (S), můžeme spočítat hustotu toku CO_2 do listu čili rychlost fotosyntézy A :

$$A = F * (c_I - c_O) / S \quad (1)$$

Dosadíme-li za koncentrace c hodnoty v mikromolech CO_2 na mol vzduchu, za průtok F mol vzduchu za sekundu a plochu listu S v m^2 , vyjde A v $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ jak je obvyklé. Podobně z rozdílu koncentrací vodní páry ve vystupujícím (w_O) a vstupujícím (w_I) vzduchu, z průtoku vzduchu F a plochy listu S přístroj vypočítá rychlost transpirace E :

$$E = F * (w_O - w_I) / S \quad (2)$$

Spočtená rychlost transpirace E (obvykle v $\text{mmol (vody) m}^{-2} (\text{listu}) \text{s}^{-1}$), změřená teplota listu (T_l) a koncentrace vodní páry ve vzduchu v listové komoře (w_O) nám umožní spočítat vodivost listu pro difuzi vodní páry g_l . (Vzduch se v komoře se intenzivně míchá ventilátorem, a proto jsou koncentrace vody i CO_2 kolem listu rovny koncentracím na výstupu z komory. Díky intenzivnímu míchání vzduchu je také tloušťka nemíchané vrstvy vzduchu nad listem velmi malá, její difúzní vodivost tedy velká a toky vody a CO_2 mezi listem a okolním vzduchem limitují prakticky jen průduchy svojí otevřeností a počtem (průduchy jsou vzhledem k nemíchané hraniční vrstvě umístěny v sérii). Propustnost kutikuly pro vodu i CO_2 je naopak velmi malá, a protože je vzhledem k průduchům paralelně, můžeme vodivost kutikuly zanedbat.) Proto budeme vodivost listu g_l považovat za totožnou s vodivostí průduchů g_s . Vodivost průduchů pro vodní páru g_{sw} tedy je

$$g_{sw} = E / (w_{T_l}^s - w_O), \quad (3)$$

kde exponent s značí nasycenou koncentraci při teplotě listu T_l . Difúzní vodivost pak vyjde ve stejných jednotkách jako transpirace nebo fotosyntéza (např. v $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$). Dostupnost CO_2 pro karboxylační reakce je ovlivněna vodivostí průduchů. Protože vodivost není nekonečně velká, koncentrace CO_2 v atmosféře (c_a) je vyšší než koncentrace CO_2 uvnitř listu (c_i). Pro studium fotosyntézy v intaktním listu je proto žádoucí "odfiltrovat" vliv průduchů a znát koncentraci CO_2 v místech za průduchy tj. v mezibuněčných prostorách listu. Známe-li rychlost fotosyntézy (A) a difúzní vodivost průduchů pro vodní páru (g_{sw}), můžeme vypočítat koncentraci CO_2 uvnitř listu c_i :

$$c_i = c_a - (1.6A / g_{sw}) \quad (4)$$

koeficient 1.6 zde převádí difúzní vodivost pro vodní páru na difúzní vodivost pro CO_2 . Výpočty, jejichž princip je výše uveden, za vás udělá (v dokonalejší verzi) fotosyntetický systém LI-6400, který budete používat.

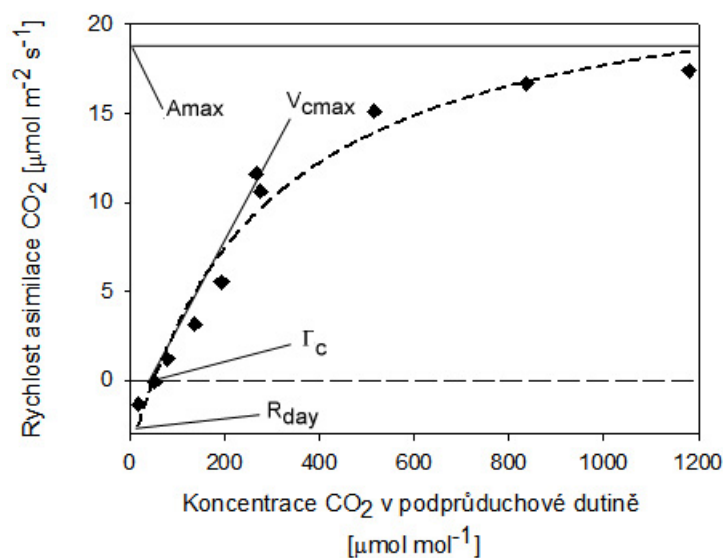
2 Analýza A/C_i a světelných křivek

Výsledkem gazometrických měření mohou být tzv. fotosyntetické křivky. CO_2 křivky fotosyntézy vyjadřují vztah mezi koncentrací CO_2 (přesněji koncentrací CO_2 v podprůduchové dutině (c_i)) a rychlosti fotosyntézy při určité teplotě a ozáření. Obdobný vztah vyjadřují

světelné křivky fotosyntézy, tj. vztah mezi ozářeností listu (resp. chloroplastů) a rychlostí fotosyntézy při určité teplotě a koncentraci CO_2 . Všeobecně mají tyto křivky lineární charakter při nízkých koncentracích CO_2 res. nízké ozářenosti. Se zvětšující se koncentrací CO_2 (resp. ozářenosti) dochází k postupné inflexi křivky. Při vysokých koncentracích resp. ozářenostech dosahují křivky konstantních hodnot, které odpovídají maximálním hodnotám A ve vztahu ke koncentraci CO_2 (resp. ozářenosti).

2.1 A/C_i křivky

Závislost rychlosti příjmu CO_2 povrchem listu (A) na koncentraci CO_2 v podprůduchové dutině (c_i) bývá označována jako A/c_i křivka fotosyntézy. Tato křivka má typický průběh blížící se nerovnoosé hyperbole a můžeme u ní rozlišit několik částí.

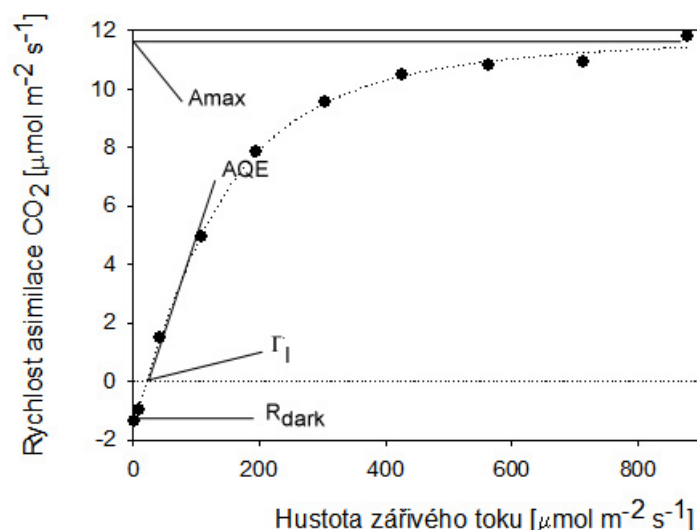


Obr. 3: Závislost rychlosti asimilace CO_2 na koncentraci CO_2 v podprůduchové dutině. V grafu jsou vyznačeny parametry charakterizující biochemickou aktivitu: Respirace na světle (R_{day}), CO_2 kompenzační bod (Γ_c), maximální rychlost karboxylace ($V_{c\text{max}}$) a maximální rychlost asimilace CO_2 A_{max}

i) Počáteční lineární část začíná v bodě výdeje CO_2 (R_{day}) při nenulové ozářenosti a nulové koncentraci CO_2 . *ii)* Při zvyšování koncentrace CO_2 dojde k dosažení tzv. kompenzačního bodu (Γ_c), kdy příjem CO_2 fotosyntézou je roven výdeji CO_2 respirací, tedy $A = 0$. V tomto stavu vůbec neprobíhá výměna plynů, přestože průduchy mohou být zcela otevřeny. Γ_c představuje důležitou charakteristiku a je citlivým parametrem pro posouzení fotosyntetické aktivity rostlin. Prostřednictvím Γ_c je možno usuzovat na produkční schopnost rostlin, protože rostliny s vysokou intenzitou fotosyntézy mají zpravidla nízkou hodnotu Γ_c . C_3 rostliny dosahují vyšších hodnot Γ_c než C_4 rostliny. *iii)* V další části je závislost lineární. A je zde limitována dostupností substrátu - tedy CO_2 a aktivitou enzymu Rubisco (Ribuloza-1,5-bisfosát karboxyláza/oxygenáza). Směrnice této lineární části určuje karboxylační aktivitu enzymu Rubisco. *iv)* Následuje inflexní část. V této hyperbolické části je závislost A/c_i nelineární. *v)* Za inflexní části křivky je A limitována množstvím substrátu pro karboxylaci - RuBP (Ribuloza-1,5-bisfosát), které je dáno rychlostí regenerace RuBP v Calvinově cyklu.

2.2 A/I křivky

Světelnou křivkou myslíme závislost rychlosti asimilace CO_2 (A) na intenzitě dopadající radiace (I). Křivka má opět charakter nerovnoosé hyperboly a můžeme ji rozdělit na několik částí.



Obr. 4: Závislost rychlosti asimilace CO_2 na intenzitě dopadající radiace. V grafu jsou vyznačeny parametry charakterizující biochemickou a biofyzikální aktivitu: Temnostní respirace (R_{dark}), světelný kompenzační bod (Γ_I), Kvantový výtěžek fotosyntézy (AQE) a maximální rychlost asimilace CO_2 A_{max}

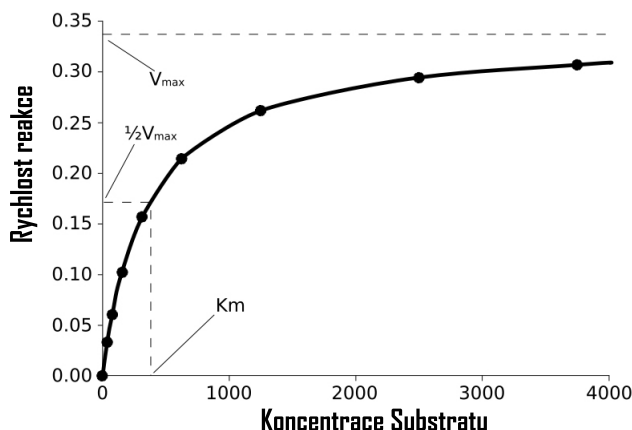
i) počáteční hodnota A světelné křivky temnostní (mitochondriální) respiraci (R_{dark}). Je to množství uvolněného CO_2 při nulové ozáření. *ii)* Při dalším nárůstu ozáření dochází k výraznému nárůstu A až k hodnotě tzv. světelného kompenzačního bodu Γ_I . *iii)* Za tímto bodem křivka získává lineárně závislý průběh v rozmezí intenzit ozáření $50\text{--}200 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Stoupání respektive směrnice lineární závislosti A/I je interpretována jako maximální kvantový výtěžek fotosyntézy (ϕ). *iv)* Za touto lineární částí můžeme pozorovat inflexi. Míru zakřivení udává parametr Θ . *v)* Po inflexi pozorujeme mírné stoupání dokud křivka nedosáhne saturační hodnoty fotosyntézy. Tato hodnota je označována jako světelná saturační rychlost asimilace CO_2 (A_{sat}).

2.3 Matematické modely fotosyntetických křivek

Tvar nerovnoosé hyperboly A/C_i a A/I křivek poukazuje na enzymatickou podstatu obou závislostí. Pro matematický popis těchto závislostí jsou používány rovnice pro enzymatické reakce, které navrhli Michaelis a Mentonová:

$$v = \frac{V_{max} * [S]}{[S] + K_m}, \quad (5)$$

kde v je rychlost pochodu, V_{max} jeho nejvyšší možná rychlost, $[S]$ koncentrace substrátu (v našem případě tedy CO_2 nebo I) K_m je Michelis-Menthenová konstanta (ta odpovídá koncentraci substrátu, při níž enzymatická reakce dosahuje poloviny maximální rychlosti).



Obr. 5: Typická závislost enzymatické reakce, ze které vychází matematický popis fotosyntetických křivek. Michaelis-Mentenová konstanta (K_m); Maximální rychlost reakce (V_{max})

Pro modelování A/C_i bylo sestaveny následující modely:

$$A_n = \frac{V_{cmax}(c_i - \Gamma_c)}{c_i + A_{nmax}} - R_{day}, \quad (6)$$

kde V_{cmax} je maximální rychlost karboxylace, c_i je koncentrace CO_2 v podprůduchové dutině, Γ_c je CO_2 kompenzační bod, R_{day} respirace na světle.

v některých případech je A/C_i závislost vyjadřována v exponenciálním tvaru:

$$A_n = a - b * e^{(-c*c_i)}, \text{ kde } b * c = CE, \quad (7)$$

kde CE je karboxylační účinnost.

Pro modelování světelných křivek je možno použít následující rovnice:

$$A_n = \frac{AQE * I * A_{max}}{\sqrt[n]{A_{max}^n + AQE^n * I^n}} - R_{dark}, \quad (8)$$

kde AQE je zdánlivá kvantová účinnost přeměny dopadající radiace, I intenzita dopadající radiace, A_{max} je maximální rychlost fotosyntézy, R_{dark} respirace za tmy.

Dalším často užívaným modelem je:

$$A_n = \frac{I + A_{max} - [(\phi * Q + A_{max})^2 - 4\phi A_{max} \Theta]^{0.5}}{2\Theta} - R_{dark}, \quad (9)$$

kde ϕ je maximální kvantový výtěžek a Θ vyjadřuje míru inflexe křivky.

Tyto matematické popisy jsou racionálním vyjádřením vlastních experimentálních výsledků, jsou vhodné pro interpolaci naměřených hodnot a umožňují z experimentálních dat odvodit parametry charakterizující biofyzikální a biochemické funkce fotosyntetického aparátu.